

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/12, 1/21, C07K 14/47, C12N 9/78, G01N 33/53	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/08946 (43) Date de publication internationale: 5 mars 1998 (05.03.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01541 (22) Date de dépôt international: 1er septembre 1997 (01.09.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/10651 30 août 1996 (30.08.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIOMERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy-l'Etoile (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SERRE, Guy [FR/FR]; Appartement 46, Résidence du Lac, 10, avenue Winston Churchill, F-31100 Toulouse (FR). GIRBAL-NEUHAUSER, Elisabeth [FR/FR]; 22, rue Matelache, F-31000 Toulouse (FR). VINCENT, Christian [FR/FR]; 16, avenue de la Saune, F-31650 Lauzerville (FR). SIMON, Michel [FR/FR]; 152, chemin du Pech, F-31750 Escalquens (FR). SEBBAG, Mireille [FR/FR]; 3, rue A. Fredeau, F-31500 Toulouse (FR). DALBON, Pascal [FR/FR]; 6, boulevard Jules Favre, F-69006 Lyon (FR). JOLIVET-REYNAUD, Colette [FR/FR]; 16, avenue des Colonnes, F-69500 Bron (FR). ARNAUD, Michel [FR/FR]; 63, rue Gervais Bussière, F-69100 Villeurbanne (FR). JOLIVET,		Michel [FR/FR]; 16, avenue des Colonnes, F-69500 Bron (FR). (74) Mandataires: VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: CA, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: ANTIGENS DERIVED FROM FILAGGRIN AND THEIR USE FOR DIAGNOSING RHEUMATOID POLYARTHRITIS (54) Titre: ANTIGENES DERIVES DES FILAGGRINES ET LEUR UTILISATION POUR LE DIAGNOSTIC DE LA POLYARTHRITE RHUMATOIDE (57) Abstract <p>The invention concerns an artificial antigen specifically identified by the anti-filaggrin autoantibodies present in the serum of patients suffering from rheumatoid polyarthritis, and consisting of one polypeptide comprising all or part of the sequence of one filaggrin unit or of a related molecule, in which an arginine radical has been substituted by a citrulline radical. The invention also concerns the use of this antigen for diagnosing rheumatoid polyarthritis.</p> (57) Abrégé <p>L'invention est relative à un antigène artificiel reconnu spécifiquement par les auto-anticorps anti-filaggrine présents dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, et constitué par un polypeptide comprenant tout ou partie de la séquence d'une unité filaggrine ou d'une molécule apparentée, dans laquelle au moins un résidu arginine a été substitué par un résidu citrulline. L'invention est également relative à l'utilisation de cet antigène pour le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

ANTIGENES DERIVES DES FILAGGRINES ET LEUR UTILISATION
POUR LE DIAGNOSTIC DE LA POLYARTHRITE RHUMATOIDE

La présente Invention est relative à de nouvelles préparations d'antigènes spécifiquement reconnus par des auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde.

La polyarthrite rhumatoïde (ci après abrégée en " PR ") est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. Il s'agit d'une maladie auto-immune, et le sérum des patients atteints contient des auto-anticorps dont certains sont spécifiques, et peuvent constituer un marqueur de cette maladie, permettant son diagnostic même à des stades précoces. Des recherches ont donc été effectuées en vue d'identifier des antigènes reconnus par ces anticorps, afin d'en obtenir des préparations purifiées utilisables dans des techniques classiques de diagnostic immunologique.

Des auto-anticorps spécifiquement présents chez les malades atteints de PR et réagissant avec un antigène épithélial oesophagien de rat ont été décrits pour la première fois par B. J. J. YOUNG et al. dans Br. Med. J. 2:97-99, (1979). Ces auto-anticorps ont été à l'époque dénommés "anticorps antikératines".

Lors de précédents travaux, l'équipe des Inventeurs a obtenu, à partir d'épithéliums malpighiens humain et murin, des préparations d'antigènes apparentés à la filaggrine et à la profilaggrine, reconnus spécifiquement par les anticorps présents dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, et montré que les " anticorps antikératines " étaient en fait des auto-anticorps anti-filaggrine (ci-après dénommés " AAF "). La Demande EP 0 511 116 décrit ces préparations antigéniques, et leur utilisation pour le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde.

Les filaggrines sont une famille de protéines qui a été identifiée chez diverses espèces, entre autres

chez l'homme, le rat, la souris, le cobaye, au niveau des épithéliums malpighiens kératinisants [pour revue sur les filaggrines, cf. DALE et al. [The Keratinocyte Handbook, Cambridge University Press, pp 323-350, (1994)]] . Elles
5 dérivent de la déphosphorylation et de la protéolyse d'un précurseur, la profilaggrine, qui est constituée essentiellement de domaines répétés de filaggrine séparés par des segments peptidiques interdomaines.

Le gène codant pour la profilaggrine se
10 compose de sous-unités répétées dont chacune code pour une molécule de filaggrine, séparées par des portions codant pour les segments peptidiques interdomaines. Toutes les unités de répétition codant pour chacune des filaggrines humaines ont la même longueur (972 paires de
15 base chez l'homme) ; cependant, chez l'homme, on observe des variations importantes (10-15%) de séquence d'une sous-unité à l'autre. Si la plupart sont conservatives, certaines de ces variations induisent des changements d'acides aminés et dans certains cas des changements de
20 la charge électrique de la protéine. Ainsi les filaggrines humaines forment, indépendamment des modifications post-transcriptionnelles, une population hétérogène de molécules de taille similaire mais de séquences et de charges (pH_i égal à $8,3 \pm 1,1$)
25 différentes [GAN et al., Biochem. 29, p. 9432-9440 (1990)] .

La profilaggrine est une protéine de poids moléculaire élevé (environ 400 000 chez l'homme) soluble en présence de fortes concentrations de sels ou d'urée.
30 Elle possède une forte teneur en acides aminés basiques (arginine et histidine), ainsi qu'en glycine, sérine et acide glutamique. Elle est pauvre en acides aminés non polaires et ne contient ni méthionine, ni cystéine, ni tryptophane. Elle est fortement phosphorylée sur des
35 résidus sérine, ce qui lui confère un point isoélectrique proche de la neutralité.

La profilaggrine est clivée en unités filaggrine au cours d'un processus complexe de maturation, impliquant une déphosphorylation, suivie d'un clivage par des protéases au niveau des segments interdomaines. Ce clivage génère d'abord des fragments de taille intermédiaire, puis les molécules fonctionnelles de filaggrine.

Les filaggrines issues de la déphosphorylation et du clivage de la profilaggrine sont des protéines basiques dont le contenu en acides aminés est similaire à celui des profilaggrines. Elles participent à l'organisation des filaments de kératine, et subissent une maturation progressive au cours de laquelle les résidus arginine, basiques, sont convertis en résidus citrulline, neutres, sous l'action de la peptidylarginine déiminase [HARDING C.R. et SCOTT I.R., J. Mol. Biol. 170, p. 651-673 (1983)]. Ceci entraîne une réduction de leur affinité pour les kératines dont elles se détachent ; elles sont alors totalement dégradées sous l'action de diverses protéases.

Les propriétés des filaggrines et des profilaggrines ont été particulièrement bien étudiées chez le rat, chez la souris et chez l'homme. La taille de la profilaggrine varie, selon les espèces, de 300 à 400 kD et celle des filaggrines de 27 à 64 kD.

Le polymorphisme observé chez l'homme entre les séquences des unités filaggrine à l'intérieur d'un même gène de profilaggrine n'apparaît pas chez le rat et la souris. Les filaggrines présentent en outre une grande variabilité inter et intra-spécifique au niveau de leur séquence. Cette variabilité n'affecte toutefois pas leurs propriétés fonctionnelles, ni leur composition globale en acides aminés, et leurs propriétés biochimiques. De même, les localisations tissulaires de la profilaggrine et des filaggrines sont identiques chez les différents mammifères étudiés.

En poursuivant leurs travaux, les Inventeurs ont constaté que la profilaggrine présente dans les granules de kératohyaline de l'épiderme humain n'était contrairement aux filaggrines, pas reconnue par les AAF[SIMON et al. Clin. Exp. Immunol. 100, 90-98 (1995)]. Ils ont alors testé la réactivité des AAF avec de la filaggrine recombinante, et ont constaté que celle-ci non plus n'était pas reconnue. D'autre part, il avait été précédemment observé que les formes des filaggrines épidermiques humaines principalement reconnues par les AAF étaient les formes acido-neutres décrites par SIMON et al. [J. Clin. Invest., 92, 1387, (1993)] et dans la demande EP 0 511 116. Le fait que ces formes acido-neutres correspondent à un stade tardif de maturation de la filaggrine, permettait de supposer que tout ou partie des modifications post-traductionnelles intervenant jusqu'à ce stade étaient impliquées dans la formation des épitopes reconnus par les AAF.

Pour vérifier cette hypothèse, les Inventeurs ont cherché à reproduire *in vitro*, à partir de filaggrine recombinante, ces modifications post-traductionnelles, afin de déterminer lesquelles étaient susceptibles d'influer sur l'antigénicité de la filaggrine.

Ils ont ainsi constaté qu'en fait, la citrullination de la filaggrine suffisait à générer des épitopes reconnus par les AAF. En effet, ils ont observé, en procédant à la déimination *in vitro* de filaggrine recombinante que le remplacement d'au moins une partie des arginines par des citrullines permet l'obtention d'un antigène reconnu spécifiquement par les AAF présents dans le sérum des patients atteints de PR.

La présente Invention a pour objet un antigène artificiel reconnu spécifiquement par les AAF présents dans le sérum des patients atteints de PR, caractérisé en ce qu'il est constitué par un polypeptide recombinant ou de synthèse, comprenant tout ou partie d'une séquence

dérivée de celle d'une unité filaggrine ou d'une molécule apparentée, par substitution d'au moins un résidu arginine par un résidu citrulline. De préférence, un antigène conforme à l'invention comprend au moins 5
5 acides aminés consécutifs, et avantageusement au moins 10 acides aminés consécutifs, dont au moins une citrulline, de ladite séquence.

Au sens de la présente Invention, on entend par : " unité filaggrine ", un polypeptide dont la
10 séquence est celle du produit de traduction de l'une quelconque des sous-unités codant pour un domaine filaggrine du gène de la profilaggrine humaine ou d'une autre espèce, ou bien est une séquence consensus, séquence théorique obtenue à partir des séquences des
15 domaines filaggrine.

Au sens de la présente Invention, on entend par : " molécule apparentée " toute molécule ayant au moins un résidu arginine susceptible d'être transformé en résidu citrulline sous l'action d'une PAD (peptidyl
20 arginine déiminase) ; à titre d'exemple, cette PAD peut être une PAD de muscle de lapin, comme le montrent les exemples ci-après. Il est cependant à la portée de l'homme de l'art de sélectionner toute autre PAD appropriée par de simples essais de routine, en la
25 faisant réagir avec la filaggrine humaine non-citrullinée.

Le terme "peptide" tel qu'utilisé dans la présente Demande signifie notamment protéine ou fragment de protéine, oligopeptide, extrait, séparé ou
30 substantiellement isolé ou synthétisé, notamment ceux obtenus par synthèse chimique ou par expression dans un organisme recombinant ; tout peptide dans la séquence duquel un ou plusieurs acides aminés de la série L sont remplacés par un acide aminé de la série D, et vice-
35 versa ; tout peptide dont l'une au moins des liaisons CO-NH, et avantageusement toutes les liaisons CO-NH de la

chaîne peptidique est (sont) remplacée(s) par une (des) liaisons NH-CO ; tout peptide dont l'une au moins des liaisons CO-NH et avantageusement toutes les liaisons CO-NH est ou sont remplacée(s) par une ou des liaison(s) NH-CO, la chiralité de chaque résidu aminoacyle, qu'il soit impliqué ou non dans une ou plusieurs liaisons CO-NH sus-mentionnées, étant soit conservée, soit inversée par rapport aux résidus aminoacyles constituant un peptide de référence, ces composés étant encore désignés immunorétroïdes, un mimotope, etc.

Des antigènes conformes à l'invention peuvent par exemple être obtenus par action de la PAD sur des protéines ou des peptides naturels, recombinants, ou de synthèse, comportant des résidus arginine ; ils peuvent également être obtenus par synthèse peptidique, en incorporant directement un ou plusieurs résidus citrulline dans le peptide synthétisé.

Selon un mode de réalisation préféré d'un antigène conforme à la présente Invention, il est constitué par un polypeptide comprenant tout ou partie de la séquence correspondant aux acides aminés 144 à 314 d'une unité filaggrine humaine, dans laquelle au moins un résidu arginine a été substitué par un résidu citrulline, ou bien tout ou partie de la séquence correspondant aux acides aminés 76 à 144 d'une unité filaggrine humaine, dans laquelle au moins un résidu arginine a été substitué par un résidu citrulline.

Un antigène conforme à l'invention peut par exemple être constitué par un peptide comprenant tout ou partie de la séquence correspondant aux acides aminés 71 à 119 d'une unité de filaggrine humaine, dans laquelle au moins un résidu arginine a été substitué par un résidu citrulline.

Avantageusement, un antigène conforme à l'invention est constitué par un peptide comprenant tout ou partie d'au moins une séquence dérivée de l'une des

séquences identifiées dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, par substitution d'au moins un résidu arginine par un résidu citrulline.

- 5 La présente Invention a également pour objet l'utilisation des antigènes conformes à l'invention, tels que définis ci-dessus, pour le diagnostic *in vitro* de la PR.

La présente invention englobe en particulier
 10 des compositions antigéniques pour le diagnostic de la présence d'auto-anticorps spécifiques de la PR dans un échantillon biologique, lesquelles compositions sont caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins un antigène conforme à l'invention, éventuellement marqué
 15 et/ou conjugué avec une molécule porteuse.

- La présente Invention a également pour objet un procédé de détection des auto-anticorps de classe G spécifiques de la PR dans un échantillon biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :
- 20 - la mise en contact dudit échantillon biologique avec au moins un antigène conforme à l'Invention, tel que défini ci-dessus, dans des conditions permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps avec les auto-anticorps spécifiques de la PR éventuellement présents ;
- 25 - la détection, par tous moyens appropriés, du complexe antigène/anticorps éventuellement formé.

Ce procédé de détection peut être mis en oeuvre grâce à un nécessaire comprenant au moins un antigène selon l'Invention, ainsi que des tampons et
 30 réactifs appropriés pour la constitution d'un milieu réactionnel permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps, et/ou des moyens de détection dudit complexe antigène/anticorps

Ledit nécessaire peut également comprendre, le
 35 cas échéant, des échantillons de référence, tels qu'un ou plusieurs sérum(s) négatif(s) et un ou plusieurs sérum(s)

positif(s).

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation et de mise en œuvre d'antigènes conformes à l'invention.

EXEMPLE 1 : REACTIVITE DES SERUMS PROVENANT DE PATIENTS ATTEINTS DE POLYARTHRITE RHUMATOIDE SUR LES FILAGGRINES EPIDERMQUES

On broie à l'aide d'un broyeur de type " potter " électrique un lambeau d'épiderme humain dans un tampon à haute concentration en urée (6M), ce qui permet de solubiliser l'ensemble des filaggrines épidermiques.

Avec cet extrait épidermique, on réalise une électrophorèse bidimensionnelle (gel 8-25% d'acrylamide, en présence d'urée 6M); la 1ère dimension correspond à une isoélectrofocalisation sur gel dans un gradient de pH allant de 5 à 8 et la seconde dimension correspond à une électrophorèse en conditions dénaturantes, en présence de SDS. Après électrophorèse, les protéines du gel sont transférées sur nitrocellulose.

Les réactions immunologiques sont effectuées selon un protocole classique.

La membrane de nitrocellulose est incubée pendant une nuit à 4°C avec un sérum de patient atteint de PR, dilué au 1/2000, puis les immunoglobulines du sérum qui ont réagi avec les antigènes fixés sur la membrane sont détectées à l'aide d'un anticorps secondaire anti-IgG humaines marqué à la peroxydase. La révélation en présence du substrat de la peroxydase est effectuée par la méthode ECL (Enhanced Chemi-Luminescence, AMERSHAM) selon le protocole préconisé par le fabricant.

Dans un deuxième temps, la même membrane est lavée puis incubée pendant 1 heure et demie à 20°C, en présence cette fois de l'anticorps monoclonal AHF1 décrit

par SIMON et al. [J. Invest. Dermatol. 105, 432, (1995)]
à une concentration de 0,2 µg/ml, puis d'un anticorps
secondaire anti-IgG de souris marqué à la peroxydase. La
réaction est révélée par la méthode ECL, comme indiqué
5 ci-dessus.

Les résultats sont illustrés par la figure 1 :

L'anticorps monoclonal AHF1 reconnaît des
isoformes de filaggrine dont le pHi s'échelonne de 5,8 à
8,5. En revanche, seules les isoformes dont le pHi
10 s'échelonne de 5,8 à 7,4, sont détectées par le sérum du
patient atteint de PR

Le fait que seules les isoformes les plus
acides de filaggrines soient détectées, permet de
supposer que l'acidification de ces isoformes fait partie
15 des modifications post-traductionnelles qui seraient
nécessaires à la reconnaissance de la filaggrine par les
anticorps présents dans les sérums des patients atteints
de PR.

EXEMPLE 2 : DEIMINATION IN VITRO DE FILAGGRINE 20 RECOMBINANTE PAR LA PEPTIDYL ARGININE DEIMINASE (P.A.D.).

De la filaggrine recombinante est produite
selon le protocole suivant :

Un fragment d'ADN codant pour une unité
filaggrine est amplifié par PCR, à partir d'ADN génomique
25 humain (cellules RAJI : ATCC CCL86) à l'aide des 2
amorces suivantes :

Amorce 5' :

5' TTCCTATACCAGGTGAGCACTCAT 3'

Amorce 3' :

30 5' AGACCCTGAACGTCCAGACCGTCCC 3'

Le produit d'amplification est cloné dans le
site SmaI du vecteur pUC19. On procède à la sélection des
clones recombinants, en vérifiant la présence d'un insert
de 972 pb obtenu après digestion avec SacI et XbaI. Cet
35 insert est ensuite sous-cloné dans pUC19. L'insert
résultant de ce sous-clonage est ensuite transféré dans

le vecteur pGEX (commercialisé par la société PHARMACIA), entre les sites EcoRI et HindIII. Le vecteur d'expression ainsi obtenu exprime, dans *E. coli*, la filaggrine en fusion avec la glutathion-S-transférase (GST), sous 5 contrôle du promoteur procaryote Tac. La synthèse de la protéine recombinante est induite par addition d'isopropyl- β -D-galactoside (IPTG) à la culture.

La filaggrine recombinante ainsi obtenue sera dénommée ci-après : " fil-gst ".

10 On constate, après électrophorèse, l'existence de 9 fragments qui résultent d'une protéolyse post-traductionnelle de la filaggrine entière. Les emplacements des différentes coupures générant ces fragments sont indiqués sur la figure 2.

15 Le mélange des 9 fragments est soumis à une déimination *in vitro* par la peptidyl arginine déiminase.

On utilise une préparation de peptidyl arginine déiminase de muscle de lapin (681 U/ml) commercialisée par TAKARA BIOMED EUROPE, selon le 20 protocole préconisé par le fabricant.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- Milieu réactionnel : Tris-HCl 0,1 M, CaCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, pH 7,4 ;
- 25 - Rapport enzyme/substrat : 140 mU/ μ mole de filaggrine contenant 10% d'arginine soit 4 mU/ μ mole d'arginine ;
- Incubation : entre 0 et 60 mn à 50°C ;
- Arrêt de la réaction : chauffage 3 mn en

30 tampon de LAEMMLI

On effectue en parallèle les 8 réactions suivantes.

(1) BSA (sérum albumine bovine) incubée dans milieu réactionnel (1h, 50°C) sans P.A.D.

35 (2) BSA incubée dans milieu réactionnel (1h, 50°C) avec 60 mU de P.A.D.

(3) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (1h, 50°C) sans P.A.D.

(4) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (5 minutes à 50°C) avec 60 mU de P.A.D.

5 (5) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (15 minutes à 50°C) avec 60 mU de P.A.D.

(6) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (30 minutes à 50°C) avec 60 mU de P.A.D.

10 (7) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (1h à 50°C) avec 60 mU de P.A.D.

(8) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (1h à 50°C) avec 60 mU de P.A.D. et en présence de 10 mM de N-éthylmaléimide (inhibiteur de la P.A.D.).

On dépose 1 µl de chaque échantillon sur un
15 gel d'électrophorèse (gel PHAST[®]-SDS 12,5%, PHARMACIA), et on réalise l'électrophorèse avec l'appareil PHAST-SYSTEM[®] (PHARMACIA), dans les conditions préconisées par le fabricant. Après transfert sur nitrocellulose, on révèle soit avec un pool de 5 sérums de patients atteints de
20 PR, dilué au 1/2000 (Figure 3a), soit avec l'anticorps monoclonal anti-filaggrine AHF2 [SIMON et al. J. Invest. Dermatol. 105, 432, (1995)] à la concentration de 0,2 µg/ml (Figure 3b).

Le complexe antigène/anticorps est révélé à
25 l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, par la technique ECL.

Les résultats sont illustrés par la figure 3

- Piste 1 : BSA (1 heure, 50°C)
- Piste 2 : BSA + PAD (1 heure, 50°C)
- 30 Piste 3 : fil-gst (1 heure, 50°C)
- Piste 4 : fil-gst + PAD (5 minutes, 50°C)
- Piste 5 : fil-gst + PAD (15 minutes, 50°C)
- Piste 6 : fil-gst + PAD (30 minutes, 50°C)
- Piste 7 : fil-gst + PAD (1 heure, 50°C)
- 35 Piste 8 : fil-gst + PAD + inhibiteur. (1 heure, 50°C)

En l'absence de réaction de citrullination, la fil-gst n'est pas reconnue par les sérums de patients atteints de PR (Figure 3a, piste 3), alors que dès 5 minutes de citrullination (Figure 3a, piste 4), elle est
5 détectée par ces sérums. On constate une augmentation de la réactivité avec le pool de sérums quand on fait agir la P.A.D. pendant 60 minutes à 50°C (Figure 3a, piste 7).

- les fragments 1, 2, 3 (bandes repérées par des points) de la fil-gst sont fortement reconnus, après
10 citrullination, par les sérums de patients atteints de PR. Les fragments 4 et 5 (bandes repérées par des astérisques) sont également reconnus. Ces résultats permettent de supposer qu'il existe un ou plusieurs épitopes de forte affinité dans la moitié COOH-terminale
15 de la filaggrine (144 à 314), cet épitope étant répété entre les positions 76 et 144.

- l'anticorps monoclonal AHF2 reconnaît tous les fragments de fil-gst, citrullinée ou non.

20 **EXEMPLE 3 : SPECIFICITE DE LA RECONNAISSANCE DE LA FIL-GST CITRULLINEE PAR LES SERUMS**

Dans une première série d'expériences, (Figure 4a) on compare la réactivité de la fil-gst non citrullinée (fil-gst seule, 30 minutes à 50°C) et de la fil-gst citrullinée par la P.A.D. 30 minutes à 50°C avec
25 des sérums humains composés de :

- sérums de personnes normales : T(2) et T(3)
- sérums de patients atteints de PR présentant des titres élevés en AAF détectés par immunotransfert sur les variants acido-neutres de la filaggrine humaine, et
30 par immunofluorescence indirecte sur cryocoupes d'oesophage de rat : PR(6) et PR(8).
- anticorps anti-filaggrine purifiés à partir du sérum d'un patient atteint de PR par chromatographie d'affinité, sur une colonne greffée avec les isoformes
35 acido-neutres de la filaggrine humaine : AAF.

Un contrôle positif est aussi réalisé avec l'anticorps monoclonal AHF2.

Dans une seconde série d'expériences (Figure 4b), on confirme la réactivité de la fil-gst citrullinée avec une plus large série de sérums :

- 4 sérums témoins : T(4)
- 4 sérums de patients atteints de PR ne présentant pas d'AAFs détectables en immuno-transfert ou en immunofluorescence indirecte : PR(4)
- 10 - 9 sérums de patients atteints de PR avec des titres élevés en AAF (trois d'entre eux (*) ont été aussi testés dans la première série d'expérimentations) : PR(9)
- des anticorps anti-filaggrine purifiés par chromatographie d'affinité, sur une colonne greffée avec
15 les isoformes acido-neutres de la filaggrine, à partir d'un pool de sérums de 40 patients atteints de PR : AAF
- les anticorps monoclonaux AHF (1-7).

Les sérums sont utilisés à la dilution de 1/2000 ; les anticorps anti-filaggrine purifiés par
20 chromatographie d'affinité sont utilisés à la concentration de 4 µg/ml ; les anticorps monoclonaux sont utilisés à la concentration de 0,2 µg/ml

Les résultats sont les suivants :

- La citrullination de la filaggrine
25 recombinante est nécessaire pour la reconnaissance par les AAFs des sérums de patients atteints de PR (14 sérums positifs sur 14 la reconnaissent) ;

- les auto-anticorps anti-filaggrine, purifiés par chromatographie d'affinité à partir des sérums de
30 patients atteints de PR, montrent la même réactivité sur fil-gst citrullinée que les sérums de patients atteints de PR (reconnaissance des fragments correspondant aux bandes 1 à 5). Ceci montre que ce sont bien les AAF présents dans ces sérums qui reconnaissent la fil-gst
35 citrullinée.

EXEMPLE 4 : CITRULLINATION DES PEPTIDES S-47-S ET S-35-R PAR LA P.A.D., ET ESSAI DE LA REACTIVITE DES PEPTIDES CITRULLINES.

Le peptide de 49 acides aminés S-47-S de
5 séquence (code 1 lettre) :

NH₂-STGHSGSQHSHTTTQGRSDASRGSSGSRSTSRETRDQEQSGDGSRHSGS-COOH

correspondant aux acides aminés 71 à 119 de la
séquence d'une unité de filaggrine humaine, et comportant
6 résidus arginine, et

10 le peptide de 37 acides aminés S-35-R de
séquence (code 1 lettre) :

NH₂-SQDRDSQAQSEDSERRSASASRNHRGSAQEQRDGSR-COOH

correspondant aux acides aminés 155 à 191 de
la séquence d'une unité de filaggrine humaine, et
15 comportant 7 résidus arginine, ont été préparés par
synthèse peptidique. Les peptides S-47-S et S-35-R sont
représentés dans la liste de séquences en annexe sous les
numéros respectifs SEQ ID NO: 3 et SEQ ID NO: 4.

Ces 2 peptides, ainsi que la fil-gst, ont été
20 citrullinés par action de la P.A.D., pendant 30 minutes à
50°C, dans le même milieu réactionnel que celui indiqué à
l'exemple 2. Les conditions spécifiques pour chaque
peptide, et pour la fil-gst sont les suivantes :

- peptide S-47-S : 4 mU/μmole arginine
- 25 - peptide S-35-R : 2,7 mU/μmole arginine
- fil-gst : comme indiqué à l'exemple 2.

On compare, par " dot-blot ", la réactivité de
chaque peptide et celle de la fil-gst, avant et après
action de l'enzyme, vis-à-vis de l'anticorps monoclonal
30 AHF4, et du sérum d'un patient atteint de PR.

Les conditions opératoires sont les
suivantes :

- 0,5 μg par dépôt de chaque antigène
(peptides, fil-gst, variants acido-neutres de la
35 filaggrine (VAF))

- Traitement de la nitrocellulose 45 minutes à 80°C, avant immunodétection.

- sérum PR utilisé à la dilution de 1/2000 ; anticorps monoclonal AHF4 utilisé à une concentration de 0,2 µg/ml

Les résultats sont illustrés par la Figure 5, qui montre que :

- AHF4 reconnaît le peptide S-47-S et la fil-gst citrullinés ou non mais ne reconnaît pas S-35-R, citrulliné ou non.

- S-47-S est reconnu, après citrullination, par le sérum du patient atteint de PR, alors que S-35-R, citrulliné ou non, n'est pas reconnu. Le même sérum reconnaît par ailleurs les VAF et la fil-gst citrullinée, mais ne reconnaît pas la fil-gst non-citrullinée.

EXEMPLE 5 : SYNTHÈSE DES PEPTIDES E-12-H ET E-12-D CITRULLINES ET NON CITRULLINES ET ESSAI DE LA REACTIVITE DES PEPTIDES.

Les peptides E-12-H et E-12-D ont été déterminés par référence aux séquences nucléotidiques du gène de la profilaggrine humaine décrites par GAN S.Q et al. [Biochemistry, 29 : 9432-9440, (1990)].

Le peptide de 14 acides aminés E-12-H de séquence (code 1 lettre) :

NH₂-EQSADSSRHSGSGH-COOH

comprend 1 résidu arginine, et

le peptide de 14 acides aminés E-12-D de séquence (code 1 lettre) :

NH₂-ESSRDGSRHPRSHD-COOH

comprend 3 résidus arginine.

Les peptides E-12-H et E-12-D sont représentés dans la liste de séquences en annexe sous les numéros respectifs SEQ ID NO: 5 et SEQ ID NO: 6.

Ces peptides ont été préparés par synthèse peptidique en phase solide.

Les peptides E-12-H et E-12-D citrullinés ont été synthétisés directement par incorporation d'une citrulline en remplacement d'une arginine.

Pour le peptide E-12-D, seul le résidu
5 arginine correspondant au 8^{ème} acide aminé de la séquence a été remplacé par une citrulline lors de la synthèse peptidique.

La réactivité de chaque peptide citrulliné et non citrulliné a été testée respectivement vis-à-vis d'un
10 sérum normal, de deux sérums de patients PR, d'anticorps anti-filaggrine (AFAs) purifiés à partir d'un pool de 45 sérums de patients PR et d'anticorps anti-filaggrine purifiés à partir de 12 sérums de patients PR.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

15 Les puits de plaques de microtitration NUNC MAXISORP ont été revêtus respectivement à l'aide des peptides E-12-D et E-12-H non-citrullinés et citrullinés, dilués à une concentration de 5 µg/ml dans un tampon PBS (pH: 7,4) et incubés pendant une nuit à 4°C (volume
20 final : 100 µg/puits). Les puits ont été saturés pendant 30 minutes à 37°C en PBS-Tween 20, 0,05% gélatine 2,5%, 200 µl/puits. Le sérum de contrôle négatif (sérum normal) a été dilué au 1/120. Les anticorps anti-filaggrine ont été dilués en PBS-Tween 20, 0,05%-gélatine 0,5% (PBS TG)
25 de sorte que les concentrations finales en auto-anticorps anti-filaggrine soient celles indiquées dans le tableau I annexé. Le sérum de contrôle négatif, les sérums PR et les anticorps anti-filaggrine ont été ajoutés (volume final : 100 µl/puits) et soumis à incubation pendant
30 1 heure à 37°C et une nuit à 4°C. Des anticorps de chèvre anti-chaînes lourdes gamma des immunoglobulines humaines, marqués à la peroxydase (commercialisés par la société SOUTHERN BIOTECHNOLOGIES) ont été ajoutés dans chaque puits (dilution en PBSTG : 1/2000, volume final :
35 100 µl/puits) et soumis à incubation pendant 1 heure à

37°C. La révélation a été effectuée par addition d'orthophénylènediamine (2mg/ml, pendant 10 minutes).

Les résultats présentés dans le tableau I annexé sont donnés en rapport de DO à 492 nm : signal
5 peptide citrulliné/signal peptide non-citrulliné.

Ces résultats montrent que, dans la majorité des cas, le rapport en DO peptide citrulliné/peptide non-citrulliné est supérieur à 1, et illustrent donc la bonne sensibilité des peptides citrullinés par rapport aux
10 peptides non-citrullinés pour leur réactivité vis-à-vis des autoanticorps anti-filaggrine.

TABLEAU I

Peptide	Sérum de contrôle	Sérum PR1		Sérum PR2		Pool d'AFAS			AFAS purifiés à partir de 12 sérums PR												
		10*	20*	5*	10*	20*	5*	10*	20*	10*	10*	10*	10*	10*	10*	10*	10*	10*			
E-12-D	1,076	1,42	1,85	2,42	3,77	5,57	1,77	1,63	1,48	1,99	1,38	2,48	1,19	1,12	3,50	1,87	5,19	1,13	1,57	1,11	1,65
E-12-H	1	1,32	1,20	10,44	11,51	8,38	2,45	2,42	1,82	7,16	2,05	1,06	1,18	0,76	13,57	4,14	3,18	1,14	3,66	1,22	5,84

* : Concentration en AFAs en $\mu\text{g/ml}$.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: BIOMERIEUX
 - (B) RUE: Chemin de l'Orme
 - (C) VILLE: MARCY-L'ETOILE
 - (E) PAYS: FRANCE
 - (F) CODE POSTAL: 69280
-
- (A) NOM: SERRE Guy
 - (B) RUE: Résidences du Lac, Appt. 46,
10 avenue Winston Churchill
 - (C) VILLE: TOULOUSE
 - (E) PAYS: FRANCE
 - (F) CODE POSTAL: 31100
-
- (A) NOM: GIRBAL-NEUHAUSER Elisabeth
 - (B) RUE: 22 rue Matelache
 - (C) VILLE: TOULOUSE
 - (E) PAYS: FRANCE
 - (F) CODE POSTAL: 31000
-
- (A) NOM: VINCENT Christian
 - (B) RUE: 16, avenue de la Saune
 - (C) VILLE: LAUZERVILLE
 - (E) PAYS: FRANCE
 - (F) CODE POSTAL: 31650
-
- (A) NOM: SIMON Michel
 - (B) RUE: 152, chemin du Pech
 - (C) VILLE: ESCALQUENS
 - (E) PAYS: FRANCE
 - (F) CODE POSTAL: 31750
-
- (A) NOM: SEBBAG Mireille
 - (B) RUE: 3, rue A. Fredeau
 - (C) VILLE: TOULOUSE
 - (E) PAYS: FRANCE
 - (F) CODE POSTAL: 31500
-
- (A) NOM: DALBON Pascal
 - (B) RUE: 6, boulevard Jules Fabre
 - (C) VILLE: LYON
 - (E) PAYS: FRANCE
 - (F) CODE POSTAL: 69006
-
- (A) NOM: JOLIVET-REYNAUD Colette
 - (B) RUE: 16, avenue des Colonnes
 - (C) VILLE: BRON
 - (E) PAYS: FRANCE
 - (F) CODE POSTAL: 69500

- (A) NOM: ARNAUD Michel
- (B) RUE: 63, rue Gervais Bussière
- (C) VILLE: VILLEURBANE
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 69100

- (A) NOM: JOLIVET Michel
- (B) RUE: 16, avenue des Colonnes
- (C) VILLE: BRON
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 69500

(ii) TITRE DE L' INVENTION: ANTIGENES DERIVES DES FILAGGRINES ET LEUR UTILISATION POUR LE DIAGNOSTIC DE LA POLYARTHRITE RHUMATOIDE

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 6

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TTCCTATACC AGGTGAGCAC TCAT

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

AGACCCTGAA CGTCCAGACC GTCCC

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 49 acides aminés

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

Ser Thr Gly His Ser Gly Ser Gln His Ser His Thr Thr Thr Gln Gly
1 5 10 15

Arg Ser Asp Ala Ser Arg Gly Ser Ser Gly Ser Arg Ser Thr Ser Arg
20 25 30

Glu Thr Arg Asp Gln Glu Gln Ser Gly Asp Gly Ser Arg His Ser Gly
35 40 45

(2) INFORMATION POUR LA SEO ID NO: 4:

(A) LONGUEUR: 37 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS:
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

Ser Gln Asp Arg Asp Ser Gln Ala Gln Ser Glu Asp Ser Glu Arg Arg
1 5 10 15

Ser Ala Ser Ala Ser Arg Asn His Arg Gly Ser Ala Gln Glu Gln Ser
20 25 30

Arg Asp Gly Ser Arg
35

(A) LONGUEUR: 14 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS:
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

Glu Gln Ser Ala Asp Ser Ser Arg His Ser Gly Ser Gly His
1 5 10

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 14 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(C) NOMBRE DE BRINS:

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Glu Ser Ser Arg Asp Gly Ser Arg His Pro Arg Ser His Asp
1 5 10

REVENDEICATIONS

- 1) Antigène artificiel reconnu spécifiquement par les auto-anticorps anti-filaggrine présents dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, caractérisé en ce qu'il est constitué par un polypeptide recombinant ou de synthèse, comprenant tout ou partie d'une séquence dérivée de celle d'une unité filaggrine ou d'une molécule apparentée, par substitution d'au moins un résidu arginine par un résidu citrulline.
- 2) Antigène artificiel selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par un peptide comprenant tout ou partie d'au moins une séquence dérivée :
 - de la séquence correspondant aux acides aminés 144 à 314 d'une unité filaggrine humaine, ou bien
 - de la séquence correspondant aux acides aminés 76 à 144 d'une unité filaggrine humaine,
 par substitution d'au moins un résidu arginine par un résidu citrulline.
- 3) Antigène artificiel selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est constitué par un peptide comprenant tout ou partie d'au moins une séquence dérivée de la séquence correspondant aux acides aminés 71 à 119 d'une unité de filaggrine humaine, par substitution d'au moins un résidu arginine par un résidu citrulline.
- 4) Antigène artificiel selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par un peptide comprenant tout ou partie d'au moins une séquence dérivée de l'une des séquences SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, par substitution d'au moins un résidu arginine par un résidu citrulline.
- 5) Utilisation d'un antigène selon une quelconque des revendications 1 à 4 pour le diagnostic *in vitro* de la polyarthrite rhumatoïde.
- 6) Composition antigénique pour le diagnostic de la présence d'auto-anticorps spécifiques de la

polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un antigène selon une quelconque des revendications 1 à 4, éventuellement marqué et/ou conjugué avec une molécule porteuse .

7) Procédé de détection des auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

- 10 - la mise en contact dudit échantillon biologique avec au moins un antigène selon une quelconque des revendications 1 à 4, dans des conditions permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps avec les auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde éventuellement
- 15 présents ;
- la détection, par tous moyens appropriés, du complexe antigène/anticorps éventuellement formé.

8) Nécessaire pour la détection des auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un antigène selon une quelconque des revendications 1 à 4, ainsi que des tampons et réactifs appropriés pour la constitution d'un milieu réactionnel permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps,

25 et/ou des moyens de détection dudit complexe antigène/anticorps.

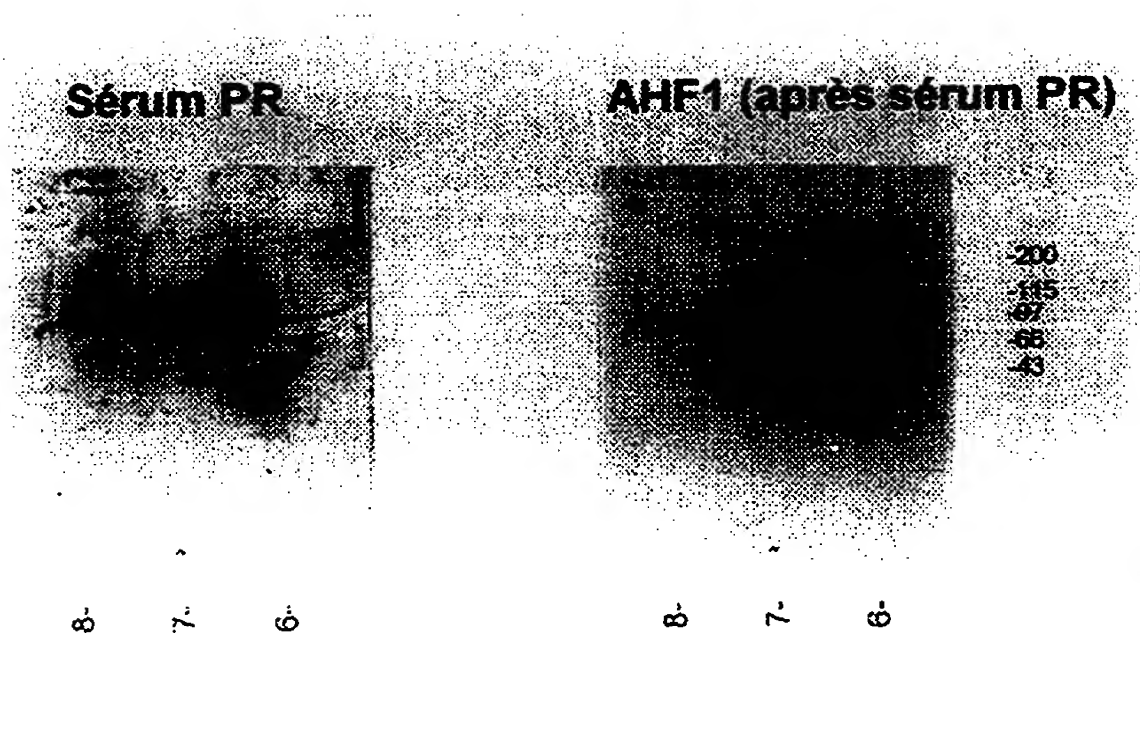


FIG.1

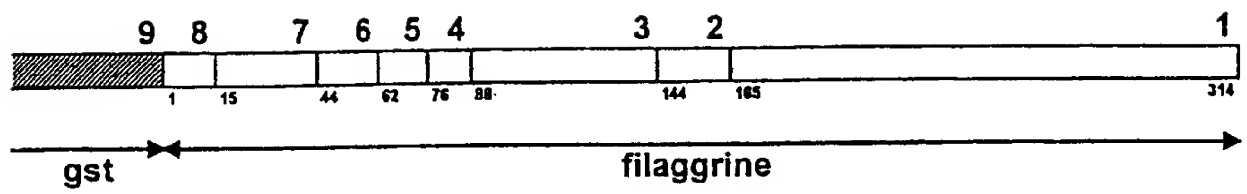


FIG.2

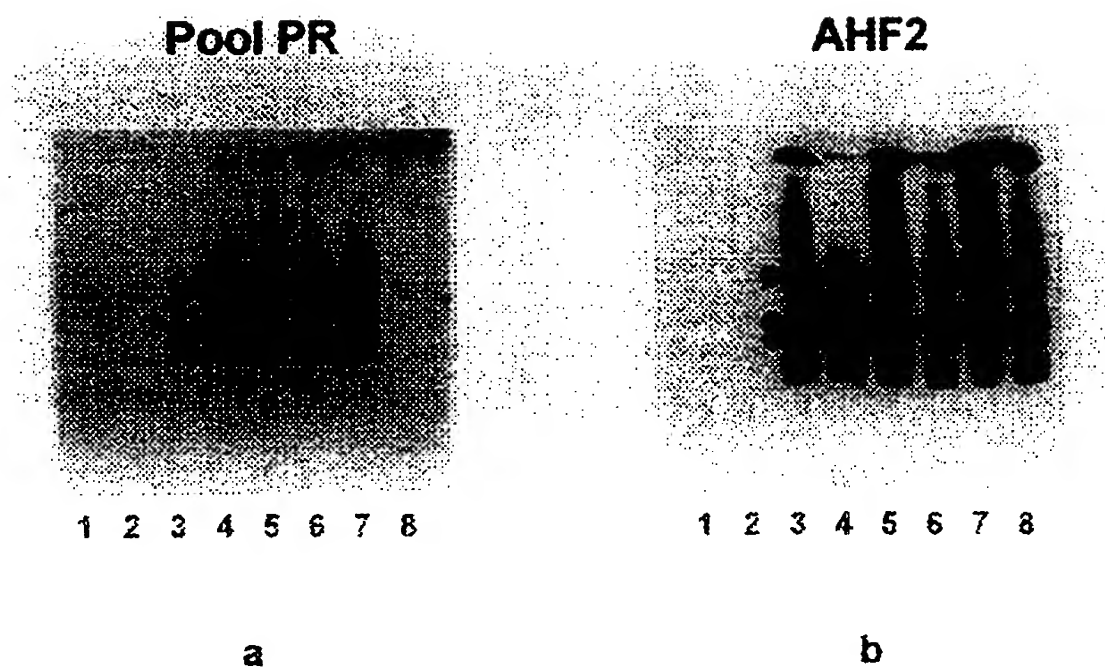
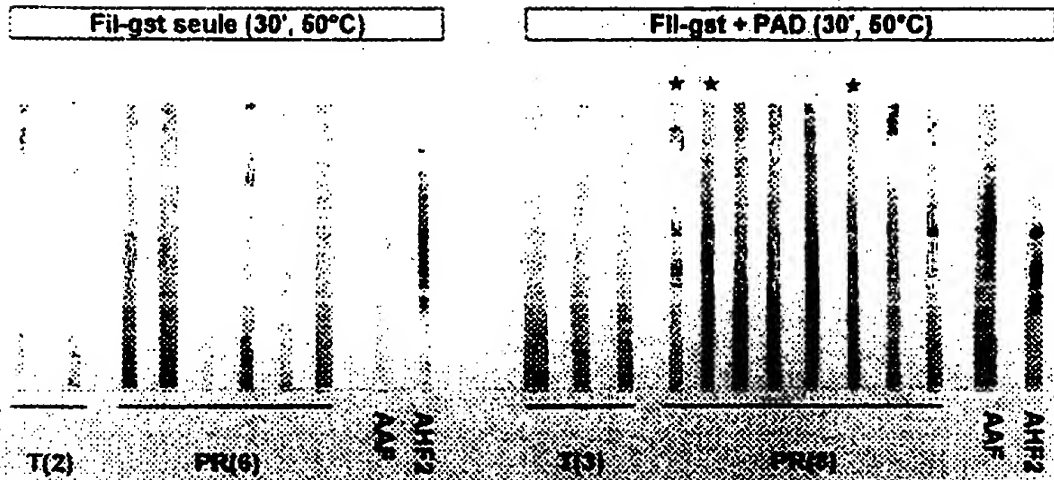


FIG.3

a



b

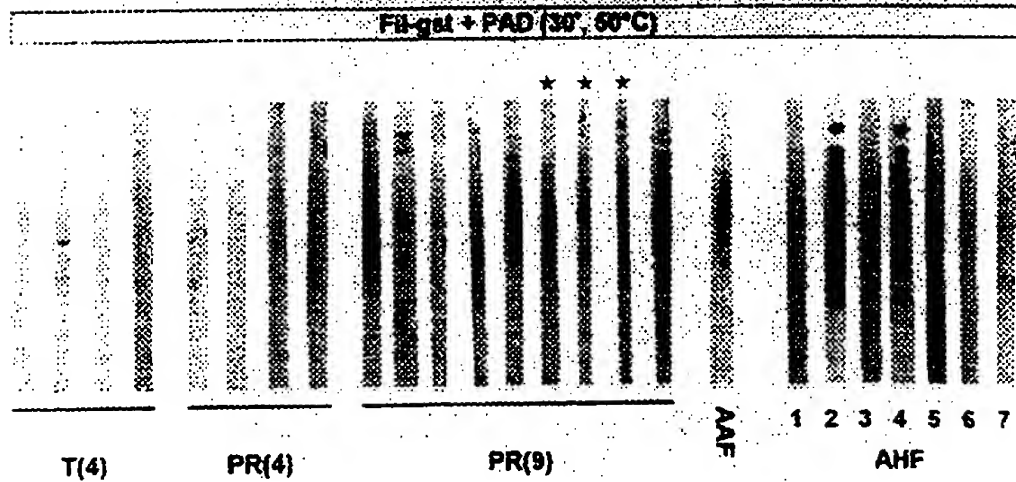


FIG.4

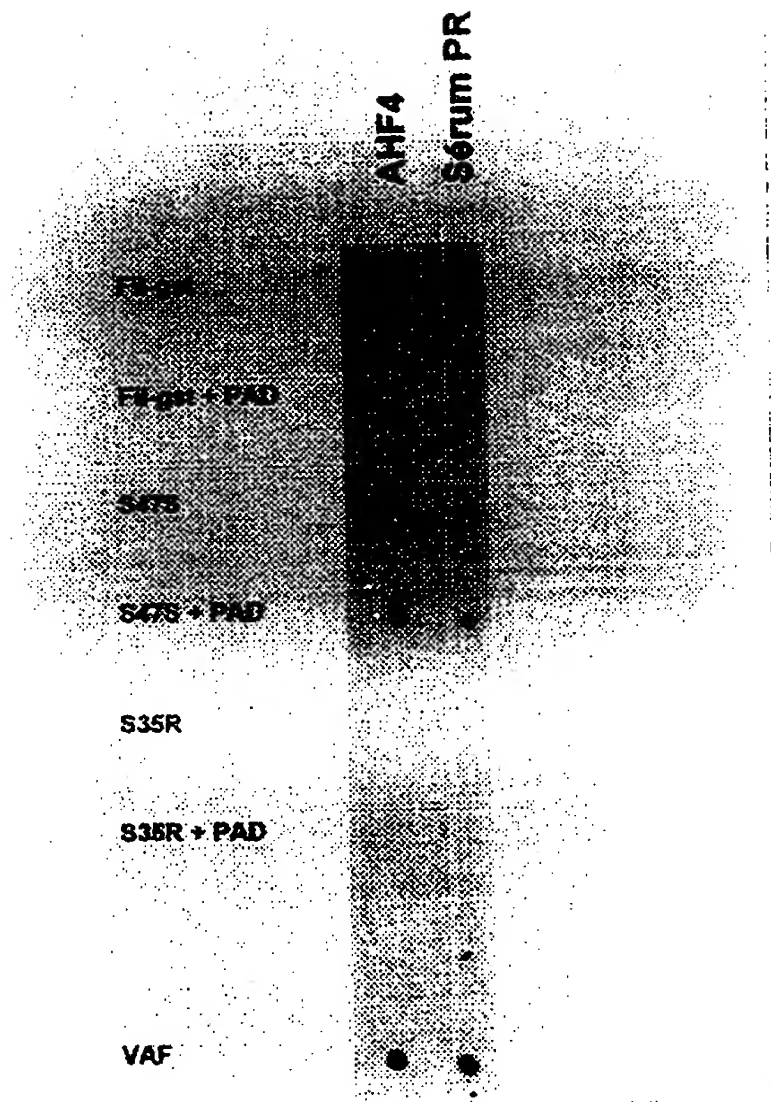


FIG.5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/FR 97/01541

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C12N1/21 C07K14/47 C12N9/78 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 19649 A (CLONATEC) 12 November 1992 cited in the application see the whole document	1,4-7
A	WO 89 07764 A (HOFFMANN LA ROCHE) 24 August 1989 see the whole document	1-7
A	SIMON, M., ET AL.: "THE CYTOKERATIN FILAMENT-AGGREGATING PROTEIN FILAGGRIN IS THE TARGET OF THE SO-CALLED "ANTI-KERATIN ANTIBODIES", AUTOANTIBODIES SPECIFIC FOR RHEUMATOID ARTHRITIS" THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 92, no. 3, 1993, pages 1387-1393, XP000673439 cited in the application see the whole document	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 December 1997

Date of mailing of the international search report

18/12/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/01541

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SIMON, M., ET AL .: "MONOCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN EPIDERMAL FILAGGRIN, SOME NOT RECOGNIZING PROFILAGGRIN" THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 105, no. 3, September 1995, pages 432-437, XP000673460 see the whole document ---	1-7
A	GAN, S-Q., ET AL .: "ORGANIZATION, STRUCTURE, AND POLYMORPHISMS OF THE HUMAN PROFILAGGRIN GENE" BIOCHEMISTRY, vol. 29, 1990, pages 9432-9440, XP002030710 cited in the application see the whole document -----	1-7

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9219649 A	12-11-92	FR 2675805 A	30-10-92
		FR 2681600 A	26-03-93
		CA 2084876 A	27-10-92
		EP 0511116 A	28-10-92
		JP 6502187 T	10-03-94
WO 8907764 A	24-08-89	AT 38988 A	15-11-93
		AU 3039589 A	06-09-89
		DE 58906204 D	23-12-93
		DK 518189 A	18-10-89
		EP 0363449 A	18-04-90
		JP 2504073 T	22-11-90

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale no

PCT/FR 97/01541

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/12 C12N1/21 C07K14/47 C12N9/78 G01N33/53

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 92 19649 A (CLONATEC) 12 novembre 1992 cité dans la demande voir le document en entier ---	1,4-7
A	WO 89 07764 A (HOFFMANN LA ROCHE) 24 août 1989 voir le document en entier ---	1-7
A	SIMON, M., ET AL.: "THE CYTOKERATIN FILAMENT-AGGREGATING PROTEIN FILAGGRIN IS THE TARGET OF THE SO-CALLED "ANTI-KERATIN ANTIBODIES", AUTOANTIBODIES SPECIFIC FOR RHEUMATOID ARTHRITIS" THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 92, no. 3, 1993, pages 1387-1393, XP000673439 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-7

-/-



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 décembre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18/12/1997

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Holtorf, S

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>SIMON, M., ET AL. : "MONOCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN EPIDERMAL FILAGGRIN, SOME NOT RECOGNIZING PROFILAGGRIN" THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 105, no. 3, septembre 1995, pages 432-437, XP000673460 voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-7
A	<p>GAN, S-Q., ET AL. : "ORGANIZATION, STRUCTURE, AND POLYMORPHISMS OF THE HUMAN PROFILAGGRIN GENE" BIOCHEMISTRY, vol. 29, 1990, pages 9432-9440, XP002030710 cité dans la demande voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-7

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9219649 A	12-11-92	FR 2675805 A	30-10-92
		FR 2681600 A	26-03-93
		CA 2084876 A	27-10-92
		EP 0511116 A	28-10-92
		JP 6502187 T	10-03-94
<hr/>			
WO 8907764 A	24-08-89	AT 38988 A	15-11-93
		AU 3039589 A	06-09-89
		DE 58906204 D	23-12-93
		DK 518189 A	18-10-89
		EP 0363449 A	18-04-90
JP 2504073 T	22-11-90		
<hr/>			